



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105969759 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201610414974.3 *C02F 3/34*(2006.01)
(22)申请日 2016.06.14 *C02F 3/02*(2006.01)
(83)生物保藏信息 *C02F 3/28*(2006.01)
CICC No.23870 2015.02.11 *C12R 1/07*(2006.01)
(71)申请人 江苏瑞达环保科技有限公司 *C02F 101/22*(2006.01)
地址 224400 江苏省盐城市阜宁县滤料产 *C02F 101/38*(2006.01)
业园13号 *C02F 101/34*(2006.01)
申请人 南京林业大学 *C02F 101/20*(2006.01)
(72)发明人 付博 虞磊 周乔 刘立清
王立文 高静静
(74)专利代理机构 北京天平专利商标代理有限
公司 11239
代理人 缪友菊
(51)Int.Cl.
C12N 11/14(2006.01)

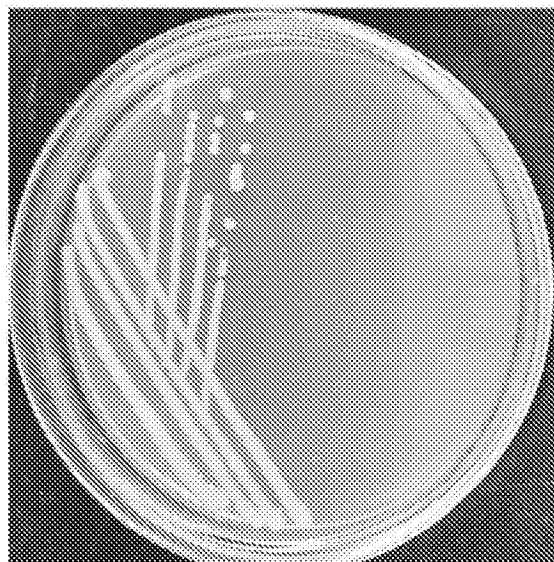
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法及应用

(57)摘要

本发明属于工业废水处理技术领域,具体涉及一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,主要包括如下步骤:将耐盐芽孢杆菌种接种于耐盐培养基中活化生长;将活化生长后的耐盐芽孢杆菌接种至活化平板培养基上培养;将活化平板培养基上培养完成的菌株接种至含有磁性纳米材料的耐盐培养基中震荡培养;将培养基体系在磁场中静置、分离,并离心收集负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌沉淀。本发明所培养的负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌株可应用于处理工业废水,具有易与废水分离、不易流失、操作简单、成本低廉以及降解效率高的特点。



1. 一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,其特征在于包括如下步骤:

(1)将耐盐芽孢杆菌种按接种率0.5~1.5%接种于耐盐培养基中震荡培养,使耐盐芽孢杆菌种在高盐环境下活化生长;震荡培养过程中摇床温度为25~35℃,转速为100~200rpm,时间为12~18h;

(2)将步骤(1)中活化后的耐盐芽孢杆菌接种至活化平板培养基上,置入30~35℃的培养箱中培养18~36h;

(3)将步骤(2)中活化平板培养基上培养完成的菌株按接种率0.5~1.5%接种至含有磁性纳米材料的耐盐培养基中震荡培养,使耐盐芽孢杆菌附着在磁性纳米颗粒上生长;震荡培养过程中摇床温度为30~35℃,转速为100~200rpm,时间为18~36h,得到负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌;

(4)将步骤(3)中完成附着生长的培养基体系在磁场中静置、分离,并离心收集负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌沉淀。

2. 根据权利要求1所述的耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,其特征在于:所述耐盐芽孢杆菌株为GS-4-08(*Bacillus* sp.),该菌株的菌落呈圆点状,淡黄色,表面光滑。

3. 根据权利要求2所述的耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,其特征在于:所述耐盐芽孢杆菌株的筛选方法包括如下步骤:

(1)取5~20g晒盐地的土壤样品,分别置于100~200ml含偶氮染料、重铬酸钾、和苯酚的高盐废水中厌氧处理5~10天;

(2)取上述厌氧处理完毕的废水5~10ml,分别接种于新鲜配置的100~200ml含偶氮染料、重铬酸钾和苯酚的高盐废水中再次厌氧处理5~10天;

(3)重复步骤(2)3~5次;取最后一次处理完毕的废水50~100 μ l均匀涂布于活化平板培养基上,待生长12~24h后,标记平板培养基上的单菌落;

(4)挑取培养基上的单菌落,接种于富集培养基中好氧生长12~36h,后全部置于100~200ml含偶氮染料的高盐废水中进行厌氧处理2~4小时,记录脱色效果最明显的菌株,保存待用;

(5)将步骤(4)中的菌株经16sRNA鉴定分析,得出细菌名称,保藏于公共保藏中心。

4. 根据权利要求1所述的耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,其特征在于:所述耐盐培养基的pH值为6~8,其配比为:葡萄糖5~10g/L, KH_2PO_4 1.5~3.5g/L, Na_2HPO_4 8~12g/L, NaCl 50~200g/L, MgSO_4 0.4~0.6g/L, FeSO_4 0.005~0.015g/L, NH_4Cl 1~3g/L;

所述活化平板培养基的pH值为7,其配比为:蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,琼脂15g,加水至1L。

5. 根据权利要求4所述的耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,其特征在于:所述磁性纳米材料颗粒为四氧化三铁,其粒径为1~100nm,其向耐盐培养基的添加量为100~300mg/L。

6. 采用权利要求1~5任一项所述的固定化培养方法制备得到的负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌在处理工业废水中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述工业废水为偶氮染料废水、重金属Cr(VI)废水、苯酚废水和含铁酸性废水中的任意一种或几种的混合液。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:废水处理过程采用厌氧处理方式或好氧处理方式。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述工业废水为偶氮染料废水和/或重金属Cr(VI)废水,处理过程采用厌氧处理方式,处理温度为25~45℃。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述工业废水为苯酚废水和/或含铁酸性废水,处理过程采用好氧处理方式,处理温度为4~45℃。

一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于工业废水处理技术领域,具体涉及一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法及应用。

背景技术

[0002] 含有偶氮染料废水、重金属Cr(VI)废水和苯酚废水是较常见的几种工业废水。其特点是可生化性差,盐度高,排放量大,污染源主要有化妆品厂、冶金厂、化工厂、纺织厂、电镀厂等,若不经有效处理而排放,通过水体和土壤的扩散,严重威胁区域的动植物及人体健康。

[0003] 加之此类工业废水的排放过程中,往往会含有高浓度的盐,较为常见的盐浓度范围为5~15%。一般认为当盐浓度超过0.3%时,即可引起细菌株的质壁分离而死亡,进而对生化处理设施中的微生物群体带来危害,严重时可能造成处理系统的瘫痪。因此,此类废水很难通过传统的物化联合生化处理而达到排放标准。而通过对耐盐菌株*Bacillus* sp.的增殖培养,再投加入到处理此类废水的生化处理系统中,即可有效避免此类活性菌株的流失,亦可大幅度提高其处理废水的能力。

[0004] *Bacillus* sp.菌株一种兼性厌氧细菌株,在环境工程的废水处理中应用较为广泛,包括提取微生物絮凝剂、降解染料、重金属和有机污染物等领域;然而利用新型的固定化培养方法且在高盐浓度条件下对多种污染进行有效降解,国内外尚未提及。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明目的在于针对现有技术的不足,提供一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法及应用。

[0006] 技术方案:本发明所述的一种耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,包括如下步骤:

[0007] (1)将耐盐芽孢杆菌种按接种率0.5~1.5%接种于耐盐培养基中震荡培养,使耐盐芽孢杆菌种在高盐环境下活化生长;震荡培养过程中摇床温度为25~35℃,转速为100~200rpm,时间为12~18h;

[0008] (2)将步骤(1)中活化后的耐盐芽孢杆菌接种至活化平板培养基上,置入30~35℃的培养箱中培养18~36h;

[0009] (3)将步骤(2)中活化平板培养基上培养完成的菌株按接种率0.5~1.5%接种至含有磁性纳米材料的耐盐培养基中震荡培养,使耐盐芽孢杆菌附着在磁性纳米颗粒上生长;震荡培养过程中摇床温度为30~35℃,转速为100~200rpm,时间为18~36h,得到负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌;

[0010] (4)将步骤(3)中完成附着生长的培养基体系在磁场中静置、分离,并离心收集负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌沉淀。

[0011] 进一步地,所述耐盐芽孢杆菌株为GS-4-08(*Bacillus* sp.);保藏名称为芽孢杆菌;保藏于中国工业微生物菌种保藏中心,保藏地址是北京市朝阳区酒仙桥中路24号6号

楼;保藏日期:2011年9月9日;保藏编号:CICC No.23870。

[0012] 进一步地,所述耐盐芽孢杆菌株的筛选方法包括如下步骤:

[0013] (1)取5~20g晒盐地的土壤样品,分别置于100~200ml含偶氮染料、重铬酸钾、和苯酚的高盐废水中厌氧处理5~10天;

[0014] (2)取上述厌氧处理完毕的废水5~10ml,分别接种于新鲜配置的100~200ml含偶氮染料、重铬酸钾和苯酚的高盐废水中再次厌氧处理5~10天;

[0015] (3)重复步骤(2)3~5次;取最后一次处理完毕的废水50~100 μ l均匀涂布于活化平板培养基上,待生长12~24h后,标记平板培养基上的单菌落;

[0016] (4)挑取培养基上的单菌落,接种于富集培养基中好氧生长12~36h,后全部置于100-200ml含偶氮染料的高盐废水中进行厌氧处理2~4小时,记录脱色效果最明显的菌株;

[0017] (5)将步骤(4)中的菌株经16sRNA鉴定分析,得出细菌名称,保藏于公共保藏中心。

[0018] 进一步地,所述耐盐培养基的pH值为6~8,其配比为:葡萄糖5~10g/L, KH_2PO_4 1.5~3.5g/L, Na_2HPO_4 8~12g/L, NaCl 50~200g/L, MgSO_4 0.4~0.6g/L, FeSO_4 0.005~0.015g/L, NH_4Cl 1~3g/L;

[0019] 所述活化平板培养基的pH值为7,其配比为:蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,琼脂15g,加水至1L。

[0020] 进一步地,所述磁性纳米材料颗粒为四氧化三铁,其粒径为1~100nm,其向耐盐培养基的添加量为100~300mg/L。

[0021] 采用上述的固定化培养方法制备得到的负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌可应用于处理工业废水。

[0022] 进一步地,所述工业废水为偶氮染料废水、重金属Cr(VI)废水、苯酚废水和含铁酸性废水中的任意一种或几种的混合液。

[0023] 进一步地,废水处理过程采用厌氧处理方式或好氧处理方式。

[0024] 进一步地,所述工业废水为偶氮染料废水和/或重金属Cr(VI)废水,处理过程采用厌氧处理方式,处理温度为25~45 $^{\circ}$ C。

[0025] 进一步地,所述工业废水为苯酚废水和/或含铁酸性废水,处理过程采用好氧处理方式,处理温度为4~45 $^{\circ}$ C。

[0026] 为检验该菌株对废水处理的效果,将按照上述方法制备的负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌投入到人工合成的工业废水基中,在温度为25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C、转速为150rpm的摇床里对废水中的污染物厌氧或好氧处理6~24小时,并定时取样分析降解数据。

[0027] 生物材料保藏:

[0028] 本发明采用的微生物由芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)诱变筛选而成,该菌株命名为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),为公众可得的微生物菌株,细菌的菌落圆点状,淡黄色,表面光滑,已保藏于中国工业微生物菌种保藏中心,保藏编号CICC No.23870,保藏日期:2011年9月9日。保藏单位的地址:北京市朝阳区酒仙桥中路24号6号楼。

[0029] 有益效果:本发明将芽孢杆菌菌种接种至含有磁性纳米材料的高盐培养基中,使该菌种在磁性纳米材料上好氧附着生长,进行诱变筛选,并进一步采用固定化培养法培养得到负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌,该负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌可应用于多种工业废水的处理中,且具有易与废水分离、不易流失、操作简单、成本低廉以及降解效率

高的特点,特别是对于含偶氮染料、重金属Cr(VI)、苯酚以及含铁酸性高盐废水的处理上,效果尤其显著;采用本发明提供的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌可在厌氧条件下将150mg/L的重铬酸钾、含盐量为15%的废水在12h内降解接近100%;可在厌氧条件下对500mg/L的甲基红、含盐量为15%的废水在6h内脱色完毕;可在好氧条件下对100mg/L的苯酚、含盐量为15%的废水在24h内降解率达到45%,效果明显,利用价值高。

附图说明

[0030] 图1为本发明培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌的电子显微照片;

[0031] 图2为本发明培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌落状态图。

具体实施方式

[0032] 下面通过实施例对本发明技术方案进行详细说明,但是本发明的保护范围不局限于所述实施例。

[0033] 实施例1:

[0034] 1.1、耐盐芽孢杆菌株的筛选:

[0035] (1)取15g晒盐地的土壤样品,分别置于150ml含偶氮染料、重铬酸钾、和苯酚的高盐废水中厌氧处理8天;

[0036] (2)取上述厌氧处理完毕的废水8ml,分别接种于新鲜配置的150ml含偶氮染料、重铬酸钾和苯酚的高盐废水中再次厌氧处理8天;

[0037] (3)重复步骤(2)4次;取最后一次处理完毕的废水80 μ l均匀涂布于活化平板培养基上,待生长24h后,标记平板培养基上的单菌落;

[0038] (4)挑取培养基上的单菌落,接种于富集培养基中好氧生长24h,后全部置于150ml含偶氮染料的高盐废水中进行厌氧处理3小时,记录脱色效果最明显的菌株;

[0039] (5)将步骤(4)中的菌株经16sRNA鉴定分析,得出细菌名称,保藏于公共保藏中心;该菌株为GS~4~08(*Bacillus* sp.);保藏名称为芽孢杆菌;保藏于中国工业微生物菌种保藏中心,保藏地址是北京市朝阳区酒仙桥中路24号6号楼;保藏日期:2011年9月9日;保藏编号:CICC No.23870。该菌株的菌落呈圆点状,淡黄色,表面光滑,如图1所示,为本发明培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌的电子显微照片。

[0040] 1.2、耐盐芽孢杆菌株的固定化培养方法,包括如下步骤:

[0041] (1)用移液枪将耐盐芽孢杆菌液从菌种保存管中移取100 μ L,按接种率1%接种于含有耐盐培养基的三角瓶中,在35 $^{\circ}$ C、转速为150rpm的摇床里震荡12小时,使芽孢杆菌种在高盐环境下活化生长;

[0042] (2)用接种环蘸取少量步骤(1)中的菌液,接种至活化平板培养基上,置入30~35 $^{\circ}$ C的培养箱中培养24h;

[0043] (3)用接种环挑取活化平板培养基上培养完成的菌株接种至含有磁性纳米材料的耐盐培养基中震荡培养,使耐盐芽孢杆菌附着在磁性纳米颗粒上生长;震荡培养过程中摇床温度为30~35 $^{\circ}$ C,转速为150rpm,时间为24h,得到负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌;

[0044] 将步骤(3)中完成附着生长的培养基体系在磁场中静置三小时以上,利用磁场将菌落与培养液初步分离,然后离心收集负载磁性纳米颗粒的耐盐芽孢杆菌沉淀。

[0045] 本实施例中,所述的耐盐培养基pH值为7,其配比为:葡萄糖5g/L, KH_2PO_4 2g/L, Na_2HPO_4 10g/L, NaCl 150g/L, MgSO_4 0.5g/L, FeSO_4 0.01g/L, NH_4Cl 2g/L;含有粒径为2~50nm的四氧化三铁磁性材料200mg/L;

[0046] 所述的活化平板培养基pH值为7,其配比为:蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,琼脂15g,加水至1L。

[0047] 实施例2:将实施例1中培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌应用于含偶氮染料的高盐废水处理中,具体过程如下:

[0048] 将浓度为50~300mg/L的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌株,按体积比1.5%投入到含盐浓度为15%、含甲基红浓度为500mg/L的人工合成废水中进行降解效果检验,并将整个体系置于厌氧反应器中,向厌氧反应器中通入5min氮气,密闭后置入低速振荡器中震荡培养。设置摇速50rpm,在降解1小时、2小时和6小时分别取适量液体经过磁场分离、离心、再取上清液在分光光度计中420nm处进行读数。本实施例分为五组平行试验,每一组的降解温度分别设置在25、30、35、40、45℃,实验结果见表1。

[0049] 表1 本发明名菌株对含甲基红的高盐废水处理效果

[0050]

反应温度(℃)	1小时脱色率(%)	2小时脱色率(%)	6小时脱色率(%)
25	28.5	42.6	92.3
30	33.3	56.1	100
35	45.5	70.3	100
40	44.2	68.5	100
45	42.6	60.2	95.4

[0051] 实施例3:将实施例1中培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌应用于含重铬酸钾的高盐废水处理中,具体过程如下:

[0052] 将浓度为50~300mg/L的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌株,按体积比1%投入到含盐浓度为15%、重铬酸钾浓度为150mg/L的人工合成废水中进行降解效果检验,并将整个体系置于厌氧反应器中,向厌氧反应器中通入5min氮气,密闭,置入低速振荡器中震荡培养。设置摇速50rpm,每隔8小时取适量液体经过磁场分离、离心、再取上清液在原子吸收分光光度计和化学滴定法进行分析测量。本实施例分为五组平行试验,每一组的降解温度分别设置在25、30、35、40、45℃,实验结果见表2。

[0053] 表2 本发明名菌株对含重铬酸钾的高盐废水处理效果

[0054]

反应温度(℃)	8小时脱色率(%)	16小时脱色率(%)	24小时脱色率(%)
25	34.5	58.6	74.3
30	40.3	68.5	85.0
35	49.5	70.3	96.5
40	46.2	75.3	90.7
45	35.6	54.2	71.4

[0055] 实施例4:将实施例1中培养得到的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌应用于含苯酚的高盐废水处理中,具体过程如下:

[0056] 将浓度为50~300mg/L的负载磁性纳米粒子的耐盐芽孢杆菌株,按体积比1.2%投入含盐浓度为15%、含苯酚浓度为100mg/L的人工合成废水中,进行降解效果检验,将整个体系置于好氧反应器中,并置入振荡器中震荡培养。设置摇速150rpm,每隔4小时取适量液体经过磁场分离、离心、再取上清液在气相色谱氢火焰离子检测器进行分析测量。本实施例分为五组平行试验,每一组的降解温度分别设置在25、30、35、40、45℃,实验结果见表3。

[0057] 表3 本发明名菌株对含苯酚的高盐废水处理效果

[0058]

反应温度(℃)	4小时降解率(%)	8小时降解率(%)	12小时降解率(%)
25	27.2	33.4	37.3
30	29.3	38.5	41.2
35	26.5	37.3	44.8
40	28.8	35.1	43.7
45	19.8	28.3	32.9

[0059] 如上所述,尽管参照特定的优选实施例已经表示和表述了本发明,但其不得解释为对本发明自身的限制。在不脱离所附权利要求定义的本发明的精神和范围前提下,可对其在形式上和细节上作出各种变化。

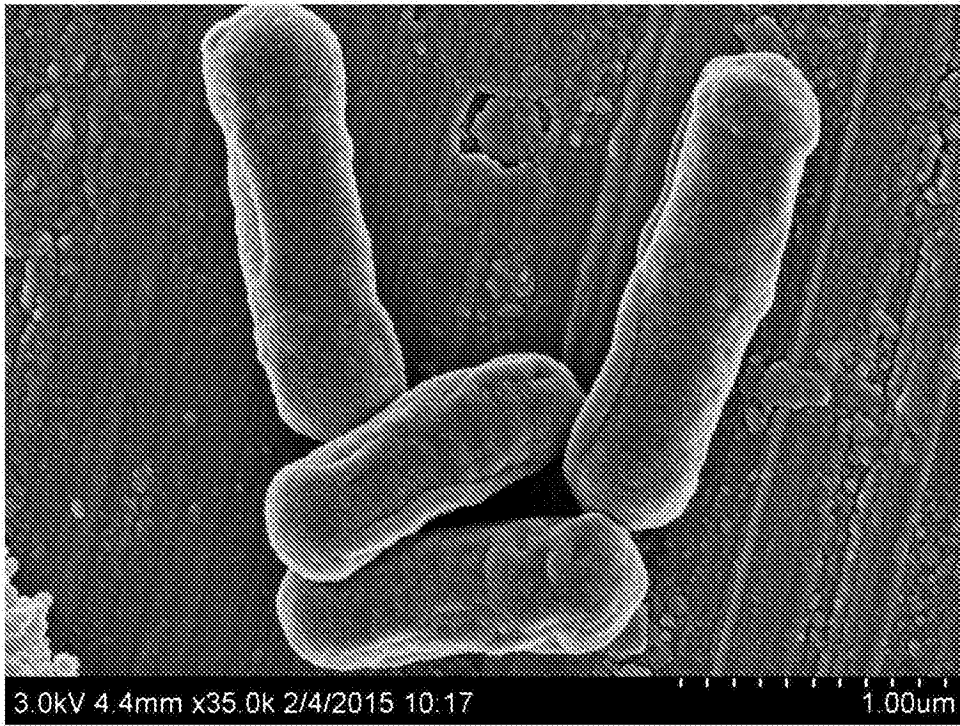


图1

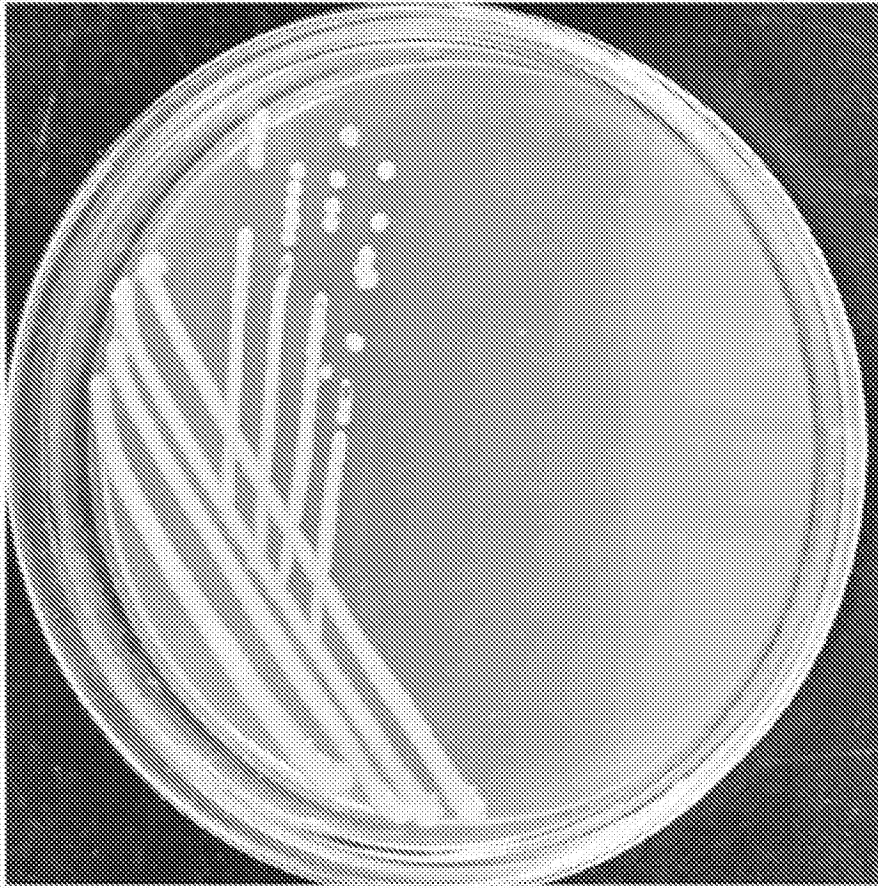


图2